

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 08189929
PUBLICATION DATE : 23-07-96

APPLICATION DATE : 11-01-95
APPLICATION NUMBER : 07002563

APPLICANT : NIKKEN FOOD KK;

INVENTOR : MATSUKI KAZUMI;

INT.CL. : G01N 33/50 G01N 30/88

TITLE : NEW METHOD FOR MEASURING OXIDATIVE DAMAGE OF DNA BY USING
HYDROXY RADICAL (OH)

ABSTRACT : PURPOSE: To easily measure the degree of suppression of the oxidative damage of DNA caused by foods by means of an in-vitro system by using the produced amount of 8-OHdG (8-hydroxydeoxyguanosine) as the index of the degree of oxidative damage of DNA caused by OH radical.

CONSTITUTION: The degree of oxidative damage of DNA caused by OH radical is measured by means of an in-vitro system by using the produced amount of 8-OHdG as an index. In addition, the oxidation of 2' deoxyguanosine which is considered to be a site to be damaged in the structure of DNA molecules is induced and the oxidized 2' deoxyguanosine is used as the model of the oxidative damage of DNA. This reaction does not take long time and does not require any complicated container, because the reaction is caused by inducing the oxidation of the 2' deoxyguanosine by sending compressed air into a sample solution and generating OH radical through a Fenton's reaction. In addition, since the produced amount of 8-OHdG is measured by using high precision liquid chromatography, the measurement can be continued in a non-attended state when the measurement is repeatedly performed due to a large number of samples.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-189929

(43) 公開日 平成 8 年 (1996) 7 月 23 日

(51) Int.Cl. ⁹	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/50	P			
30/88	E			

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平7-2563

(22) 出願日 平成 7 年 (1995) 1 月 11 日

(71) 出願人 591137031

日研フード株式会社

静岡県袋井市春岡723-1

(72) 発明者 越智 宏倫

静岡県袋井市春岡693-20

(72) 発明者 ナラシマン・ラマランナム

静岡県袋井市春岡723番地の1 日研フ
ード株式会社内

(72) 発明者 杉山 裕之

静岡県袋井市春岡723番地の1 日研フ
ード株式会社内

(74) 代理人 弁理士 鈴木 正次

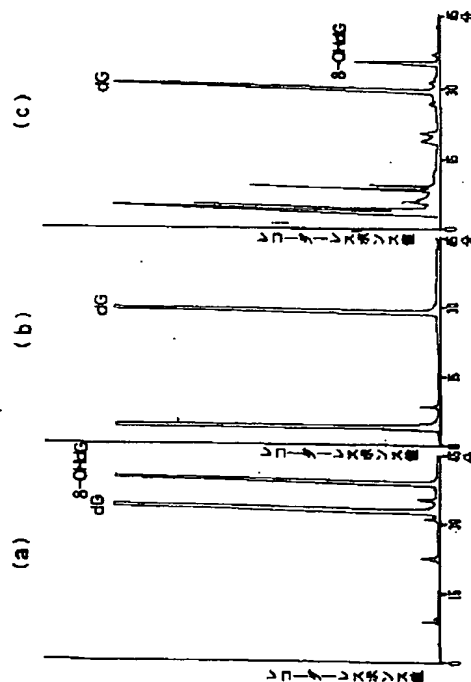
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒドロキシ (\cdot OH) ラジカルによるDNAの酸化的損傷の新測定法

(57) 【要約】

【目的】 この発明は、野菜、海藻、香辛料などいろいろな食品、または天然物から抗酸化物を夫々抽出し、それが生体のDNAの酸化的損傷に影響する度合いを、*in vitro*系で簡易に測定することを目的にしたものである。

【構成】 \cdot OHラジカルによるDNAの酸化的損傷の度合の指標を、8-OHdG生成量とし、インビトロ (*in vitro*) 系で測定することを特徴とした \cdot OHラジカルによるDNAの酸化的損傷の新測定法。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 $\cdot\text{OH}$ ラジカルによるDNAの酸化的損傷の度合の指標を、8-OHdG生成量とし、インビトロ (*in vitro*) 系で測定することを特徴としたヒドロキシ ($\cdot\text{OH}$) ラジカルによるDNAの酸化的損傷の新測定法。

【請求項2】 DNA分子の構造中、特に酸化的損傷を受けやすい部位とされる2'-デオキシグアノシンを用いてその酸化を誘導し、これをDNAの酸化的損傷のモデルとしたことを特徴とする請求項1記載のヒドロキシ ($\cdot\text{OH}$) ラジカルによるDNAの酸化的損傷の新測定法。

【請求項3】 8-OHdG (8-ヒドロキシデオキシグアノシン) の生成量は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて測定することを特徴とした請求項1記載のヒドロキシ ($\cdot\text{OH}$) ラジカルによるDNAの酸化的損傷の新測定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は $\cdot\text{OH}$ ラジカルによるDNAの酸化的損傷の度合の指標を、8-OHdG生成量とし、インビトロ (*in vitro*) 系で測定することを目的としたヒドロキシ ($\cdot\text{OH}$) ラジカルによるDNAの酸化的損傷の新測定法に関するものである。

【0002】

【従来技術】 従来DNAの酸化的損傷の指標として、8-OHdG生成量がよく用いられてきたが、多くの実験では、ラットやヒトの血清、尿中の8-OHdG生成量を測定するなど、インビボ (*in vivo*) 系で測定が行われていた。

【0003】

【発明により解決すべき課題】 DNAの酸化的損傷は、癌や糖尿病などの病気を引き起こしたり、老化の原因にもなることが知られている。そこで従来は前記のようなDNAの酸化的損傷の度合を測定する方法が採用されているが、この方法は幾多の利点がある反面、動物実験施設の設置が必要であり、ヒトの血液を用いる場合には、採血、分析の専門家を必要とするなどコストもかかり、時間もかかるうえ、個体差なども考慮に入れねばならず、数多くの試料のスクリーニングには不向きであった。

【0004】

【課題を解決する為の手段】 この発明では、DNAの酸化的損傷モデルとして、2'-デオキシグアノシンの酸化を誘導した。その反応は、試料溶液中に圧縮空気を1時間送り込み、フェントン反応で $\cdot\text{OH}$ ラジカルを発生させ、2'-デオキシグアノシンの酸化を誘導させるというもので、測定時間もかからず、装置も、空気を送り込むポンプさえあればよいというものである。また、高速液体クロマトグラフィー (以下HPLCという) による

測定も、1つの試料溶液を測定するのに約50分でできるのでサンプルが多かったり、繰り返し測定を行う場合などには、オートサンプラーに試料をセットしておけばよく、その後、人が不在でも測定の継続が可能となる。

【0005】 即ちこの発明は $\cdot\text{OH}$ ラジカルによるDNAの酸化的損傷の度合の指標を、8-OHdG生成量とし、インビトロ (*in vitro*) 系で測定することを特徴としたヒドロキシ ($\cdot\text{OH}$) ラジカルによるDNAの酸化的損傷の新測定法である。またDNA分子の構造中、特に酸化的損傷を受けやすい部位とされる2'-デオキシグアノシンを用いてその酸化を誘導し、これをDNAの酸化的損傷のモデルとしたものであり、8-OHdG (8-ヒドロキシデオキシグアノシン) の生成量は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて測定することを特徴としたものである。

【0006】

【実施例】

(1) 試料の調製

ごぼう20gを水洗後、包丁で細切し、これに500mlの水を加え、95℃で1時間煮た後、3000rpmで10分間遠心分離し、その上澄液だけをとって、沈殿物を除去する。ついで上澄液をロータリーエバポレーターにかけて、40℃でブリックス30まで濃縮し、この濃縮液を遠心濃縮機にかけ、40℃で真空中で乾固し、試料として供した。

【0007】 (2) 試薬の調製

- 1) 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8)
- 2) 10mg/mL 試料溶液 (リン酸ナトリウム緩衝液中)
- 3) 3.196mM 2'-デオキシグアノシン (dG) (9.1mg/10mL リン酸ナトリウム緩衝液)
- 4) 0.1M アスコルビン酸 (0.176g/10mL リン酸ナトリウム緩衝液)
- 5) 0.1M エチレンジアミン4酢酸 (EDTA) (0.372g/10mL リン酸ナトリウム緩衝液)
- 6) 0.1M 硫酸鉄 (II) 7水和物 (0.278g/10mL リン酸ナトリウム緩衝液)

【0008】 (3) 2'-デオキシグアノシンの酸化および8-OHdG生成量の測定

試験管内で10mg/mL 試料溶液 (500μL)、3.196mM 2'-デオキシグアノシン (780μL)、0.1M アスコルビン酸 (140μL)、0.1M EDTA (65μL) を混合し、50℃で1時間インキュベートする。これに、0.1M 硫酸鉄 (II) 7水和物 (15μL) を添加し、約20mL/minの流量で圧縮空気を流し込み、2'-デオキシグアノシンの酸化を誘導する。反応液中に生成された8-OHdG生成量を反応前と1時間反応後に高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて測定する。なお、コントロールは試料溶液を添加せず、代わりにリン酸ナトリウム緩

衝液を500 μ L 加えて、同様の実験を行った。

【0009】(4) HPLCの測定条件

カラム: Nakarai tesque COS
MOSIL-5C18 (4.6 \times 150mm)

溶媒: A液 酢酸緩衝液 (pH4.2)、B液
50%アセトニトリル/メタノール (70/30)

流量: 0.8 mL/min

カラム温度: 30℃

検出波長: 254nm

濃度勾配: B液 0分 0%
40分 10%
50分 15%

10

の処理により他の試料も処理し、同様の測定を行った結果を表1に示した。また、コントロールのインキュベーター前と後のクロマトグラムを図1に示し、ごぼう、紫大根葉、青じそ、じゃがいも、黒豆、コントロールのクロマトグラムを図2に示した。

【0011】

【表1】

【0010】以上のように実験を行った。ごぼうと同様

表1 各野菜類エキスの8-OHdG抑制測定結果

サンプル	8-OHdG生成 (%)	コントロール 比較 (%)	抑制作用 (%)
コントロール	12.58	100.00	0
カリフラワーエキス	1.82	14.47	85.53
カリフラワー生ジュース	1.94	15.42	84.58
わさび (0.6%濃度) 葉エキス	2.06	16.38	83.62
わさび (0.6%濃度) 生ジュース	2.29	18.20	81.80
芽キャベツエキス	2.43	19.32	80.68
小豆エキス	2.59	20.59	79.41
わさび (0.6%濃度) 葉エキス	2.83	22.50	77.50
ねばりけ	2.87	22.81	77.19
じゃがいもエキス	2.88	22.89	77.11
わさび (0.6%濃度) 葉生ジュース	2.91	23.13	76.87
シイタケエキス	3.02	24.01	75.99
ブロッコリーエキス	3.59	28.54	71.46
ジャロツエキス	3.79	30.13	69.87
大根エキス	3.81	30.29	69.71
青じそエキス	3.83	30.45	69.55
紫大根葉エキス	3.95	31.40	68.60
アネグリーク 葉エキス	4.04	32.11	67.89
ガリークエキス	4.05	32.19	67.81
アディックエキス	4.13	32.83	67.17
オニオンエキス	4.43	35.21	64.79
黒豆エキス	4.52	35.93	64.07
マッシュルームエキス	4.56	36.25	63.75
ピーマンエキス	4.70	37.36	62.64
ウラギ 葉エキス	5.27	41.89	58.11
大根葉エキス	5.34	42.45	57.55
コリアンダー葉エキス	5.46	43.40	56.60
緑茶エキス	5.55	44.12	55.85
紫大根エキス	6.13	48.73	51.27
ごぼうエキス	6.81	54.13	45.87

【0012】

【発明の効果】この発明によれば、簡易に invitro系での、食品によるDNAの酸化損傷の抑制の度合いが測定できる。また、食品だけでなく、薬品、化粧品などにも応用が可能である。この発明を利用して、数多くの試料のスクリーニングを行い、良い結果のでたもの

について、さらに動物実験またはヒトを被検者とした実験を行い、効果を確認できるので、測定の無駄を最少限に抑えることができる。またこの発明を利用することにより、測定について大幅なコストの削減、時間の短縮及び労力の激減ができるなどの諸効果がある。

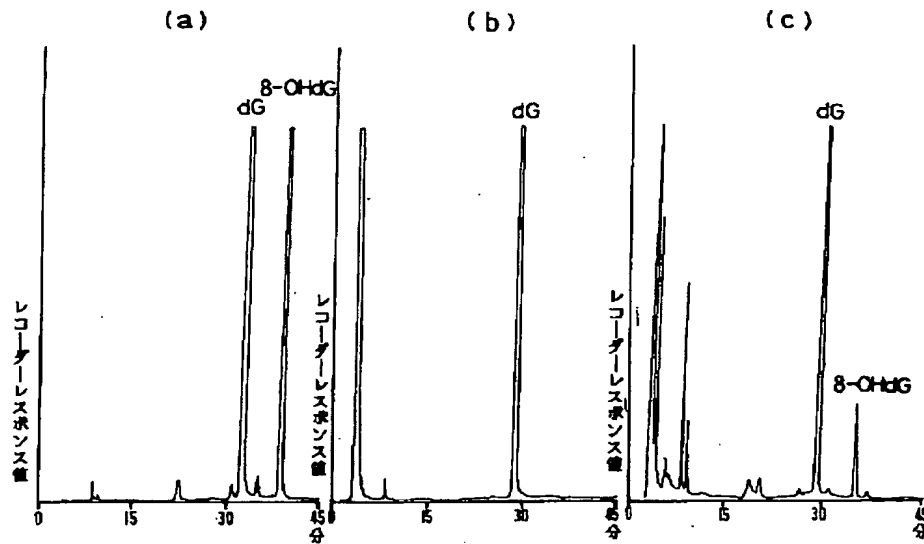
【図面の簡単な説明】

【図1】 (a) HPLCによるスタンダードの図。
 (b) 同じく50℃での・OHラジカル生成系による酸化反応前の図。
 (c) 同じく50℃での・OHラジカル生成系による酸化反応1時間後の図。

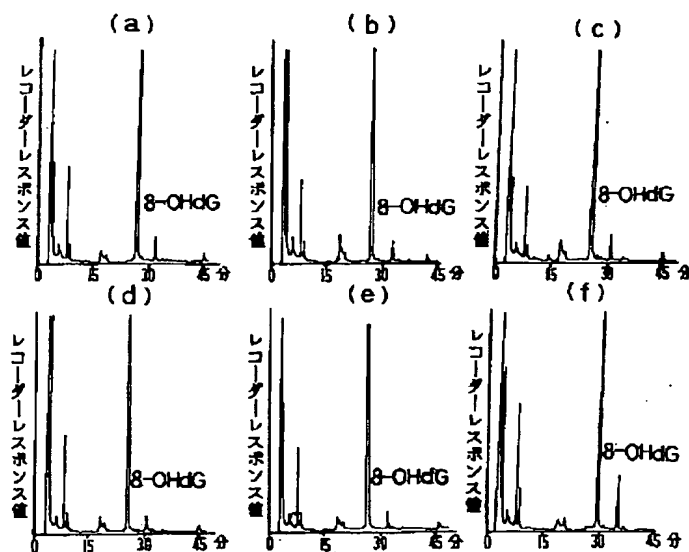
(b) 同じく紫大根葉エキスの図。(c) 同じく青しそエキスの図。(d) 同じくじゃがいもエキスの図。
 (e) 同じく黒豆エキスの図。(f) 同じくコントロールの図。

【図2】 (a) HPLCによるごぼうエキスの図。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 松木 和美
静岡県袋井市春岡723番地の1 日研フー
ド株式会社内